

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

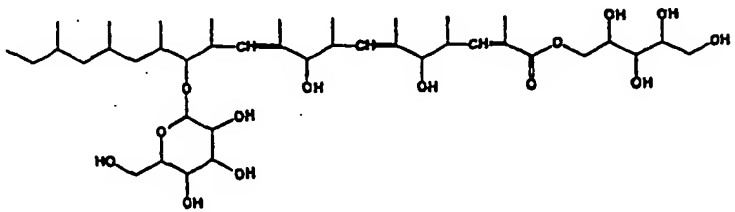
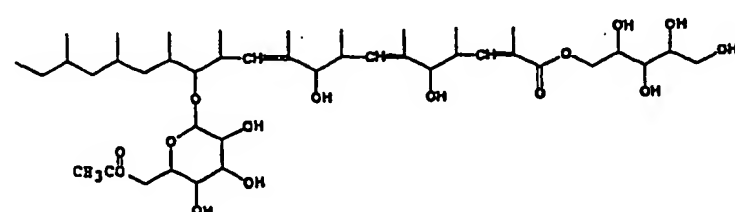
- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

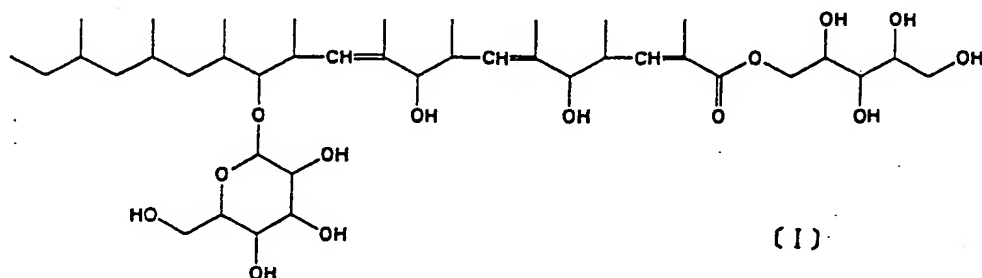
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(51) 国際特許分類6 C07H 15/10, C12P 19/44, C12N 1/14 // A61K 31/71, (C12P 19/44, C12R 1:645) (C12N 1/14, C12R 1:645)	A1	(11) 国際公開番号 WO99/41265  (43) 国際公開日 1999年8月19日(19.08.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00614  (22) 国際出願日 1998年2月16日(16.02.98)  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 社団法人 北里研究所(THE KITASATO INSTITUTE)[JP/JP] 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 大村 智(OMURA, Satoshi)[JP/JP] 供田 洋(TOMODA, Hiroshi)[JP/JP] 増間碌郎(MASUMA, Rokuro)[JP/JP] 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 社団法人 北里研究所内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 小林和憲(KOBAYASHI, Kazunori) 〒170-0004 東京都豊島区北大塚2丁目25番1号 太陽生命大塚ビル3階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, PT, RU, SK, TR, US, YU, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: NOVEL SUBSTANCES KF-1040 AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME  (54) 発明の名称 新規KF-1040物質およびその製造法  <div style="text-align: center;">  <p>(I)</p>  <p>(II)</p> </div> (57) Abstract A process for producing a substance KF-1040A represented by formula (I), and another substance KF-1040B represented by formula (II), which comprises culturing microorganisms capable of producing the substances KF-1040A and KF-1040B, thus accumulating these KF-1040A and/or KF-1040B in the liquid culture and harvesting the same from the culture. Because of the activities of inhibiting diacylglycerol transferase and sphingomyelinase, the above substances are useful in preventing and treating arteriosclerosis, obesity, thrombus, inflammation and immune function-related diseases.		

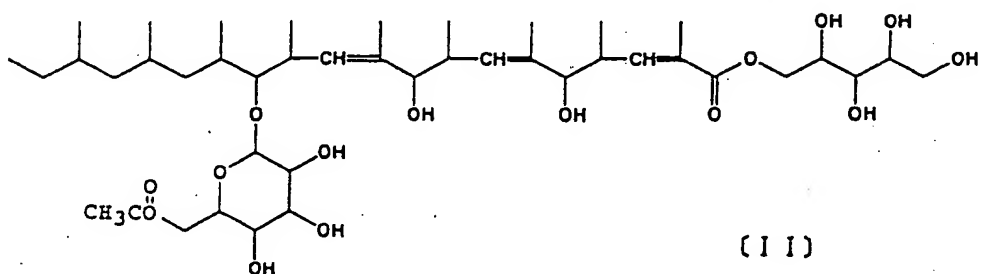
(57)要約

下記式 (I)



(I)

で表されるKF-1040A物質および下記式 (II)



(II)

で表されるKF-1040B物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養して、培養液中に該KF-1040A物質および/またはKF-1040B物質を蓄積せしめ、該培養物からKF-1040A物質および/またはKF-1040B物質を採取するものである。本発明のKF-1040物質はジアシルグリセロール転移酵素阻害活性およびスフィンゴミエリナーゼ阻害活性を示すことから、動脈硬化、肥満、血栓、炎症や免疫機能に関連した疾患の予防および治療に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦  
AL アルバニア  
AM アルメニア  
AT オーストリア  
AU オーストラリア  
AZ アゼルバイジャン  
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ  
BB バルバドス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
BY ベラルーシ  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コートジボアール  
CM カメルーン  
CN 中国  
CU キューバ  
CY キプロス  
CZ チェコ  
DE ドイツ  
DK デンマーク  
EE エストニア

ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GB 英国  
GD グレナダ  
GE ジョージア  
GH ガーナ  
GM ガンビア  
GN ギニア  
GW ギニア・ビサウ  
GR ギリシャ  
HR クロアチア  
HU ハンガリー  
ID インドネシア  
IE アイルランド  
IL イスラエル  
IN インド  
IS アイスランド  
IT イタリア  
JP 日本  
KE ケニア  
KG キルギスタン  
KP 北朝鮮  
KR 韓国  
KZ カザフスタン  
LC セントルシア

LI リヒテンシュタイン  
LK スリ・ランカ  
LR リベリア  
LS レソト  
LT リトアニア  
LU ルクセンブルグ  
LV ラトヴィア  
MC モナコ  
MD モルドヴァ  
MG マダガスカル  
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア  
共和国  
ML モリタニア  
MN モンゴル  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
MX メキシコ  
NE ニジェール  
NL オランダ  
NO ノールウェー  
NZ ニュージーランド  
PL ポーランド  
PT ポルトガル  
RO ルーマニア  
RU ロシア  
SE スウェーデン  
SG シンガポール  
SI スロヴェニア  
SK スロヴァキア  
SL シェラ・レオネ  
SN セネガル  
SZ スワジランド  
TD チャード  
TG トーゴ  
TJ タジキスタン  
TM トルクメニスタン  
TR トルコ  
TT トリニダード・トバゴ  
UA ウクライナ  
UG ウガンダ  
US 米国  
UZ ウズベキスタン  
VN ヴェトナム  
YU ニューユーゴスラビア  
ZA 南アフリカ共和国  
ZW ジンバブエ

## 明 細 書

## 新規KF-1040物質およびその製造法

発明の属する技術分野

本発明は、脂質代謝阻害活性を有する新規KF-1040物質およびその製造法に関するものである。

従来の技術

従来、いくつかの抗肥満薬や高脂血症薬物が知られている。例えば中枢性食欲抑制剤は、食欲を抑えることにより脂質生合成を減少させるものであるが、食欲を減退させるためにかえって健康を害する場合がある。それ故、副作用のない新しい抗肥満薬や高脂血症治療薬の開発が望まれている。

一方、生体膜成分である脂質の1つスフィンゴミエリンの加水分解反応は、インターロイキン- $1\beta$ や腫瘍壊死因子- $\alpha$ などのサイトカインによる細胞内情報伝達(Y. A. Hannun、ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー、269巻、3125-3128頁、1994年; R. KolesnickとD. W. Golde、セル、77巻、325-328頁、1994年)やT細胞の活性化における細胞内情報伝達(L. M. Boucherら、ジャーナル・オブ・イクスメンタルメディシン、18巻、2059-2068頁、1995年; 越智厚雄、メディシナルイムノロジー、28巻、397-401頁、1994年)に関与しており、動脈硬化、炎症、血栓症などの疾患や免疫調節機構などに働いていることが最近明らかにされてきた。しかし、このスフィンゴミエリンの加水分解酵素であるスフィンゴミエリナーゼを特異的にかつ強力に阻害する薬剤からの当該疾患に対する予防、治療薬は未だ実用化されていない。

### 発明が解決しようとする課題

近年、食生活の向上に伴い、トリアシルグリセロールの蓄積に起因した肥満症や高脂血症の患者が増加する傾向にあり、種々の病変の原因ないし誘因として治療医学および予防医学上大きな問題を提示している。トリアシルグリセロール蓄積による肥満症や高脂血症と併発しやすい病気として、動脈硬化症、脂肪肝、高血圧症、糖尿病等があり、現在これらの患者数は増加する傾向にある。

肥満症は身体の貯蔵脂肪、主としてトリグリセリドが過剰に蓄積した状態であり、トリアシルグリセロールの合成が増加し、脂肪細胞内に異常に脂肪が蓄積することに起因する。トリアシルグリセロール血症もまた、腸や肝臓でのトリアシルグリセロール合成が亢進し、血中に高トリアシルグリセロールを含んだりボタパク血症を惹起すると考えられている。したがって、トリアシルグリセロールの選択的な合成を司るジアシルグリセロールアシル転移酵素を阻害する物質は、トリアシルグリセロールの蓄積を抑制し、かかる疾病に有効であることが期待される。

かかる実情において、ジアシルグリセロールアシル転移酵素阻害活性を有する物質を提供することは、肥満症や高脂血症さらにそれに基く動脈硬化などの種々の成人病の治療上有用なことである。

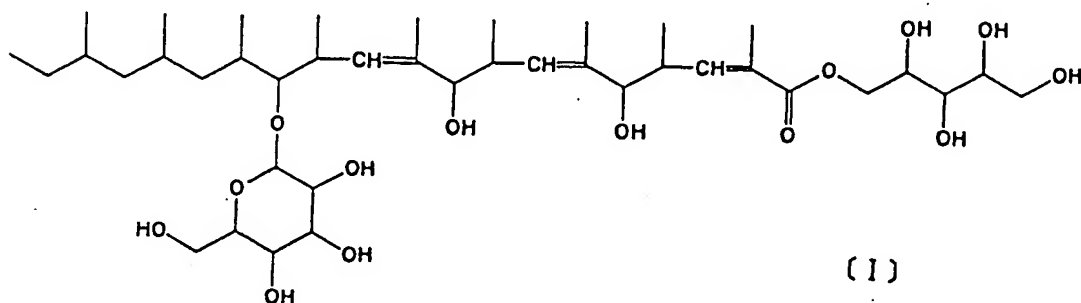
また、生体膜成分脂質であるスフィンゴミエリンを分解するスフィンゴミエリナーゼを阻害することにより今までにない新しい作用に基づく抗動脈硬化剤、抗血栓剤、抗炎症剤や免疫抑制剤として利用できることが期待される。

### 課題を解決するための手段

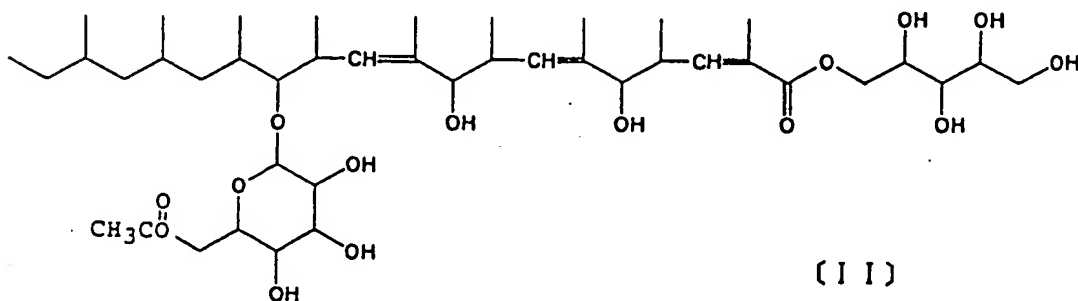
本発明者らは、微生物の生産する代謝産物について種々研究を続けた結果、新たに海藻から分離したKF-1040菌株の培養物中にジアシルグリセロール

アシル転移酵素阻害活性とスフィンゴミエリナーゼ阻害活性を有する物質が產生されることを見出した。次いで、該培養物からこれら脂質代謝を阻害する活性物質を分離、精製した結果、後記の式〔I〕および〔II〕で示される化学構造を有する物質を見出し、これらは従来全く知られていないことから、各々本物質をKF-1040A及びB物質と称することにし、その総称をKF-1040物質と称することにした。

本発明はかかる知見に基づいて完成されたものであって、下記式〔I〕



で表されるKF-1040A物質および下記式〔II〕



で表されるKF-1040B物質からなるKF-1040物質に関するものである。

本発明は更に、グリオクラジウム属に属し、KF-1040A物質および／またはKF-1040B物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培

養液中にKF-1040A物質および／またはKF-1040B物質を蓄積せしめ、該培養物からKF-1040A物質および／またはKF-1040B物質を採取するKF-1040物質の製造法に関するものである。

本発明はまた、グリオクラジウム属に属し、KF-1040A物質および／またはKF-1040B物質を生産する能力を有する微生物が、グリオクラジウム エスピー KF-1040 (*Gliocladium* sp. KF-1040、FERM BP-6251)であるKF-1040物質の製造法に関するものである。本発明は更にまた、グリオクラジウム属に属し、KF-1040A物質および／またはKF-1040B物質を生産する能力を有する微生物に関するものである。

前記の式〔I〕および〔II〕で表されるKF-1040物質を生産する能力を有する微生物（以下、「KF-1040物質生産菌」と称する）は、グリオクラジウム属に属するが、例えば本発明者らが分離したグリオクラジウム エスピー KF-1040菌株は、本発明において最も有効に使用される菌株の一例である。本KF-1040菌株の菌学的性状を示すと、以下の通りである。

#### 1. 形態的性質

本菌株は、海水（塩分濃度3.4%）を50%含むバレイショ・ブドウ糖寒天培地、コーン・ミール寒天培地、麦芽汁寒天培地、三浦寒天培地、海水澱粉寒天培地などで比較的良好に生育し、分生子の着生も良好である。

コーン・ミール寒天培地に生育したコロニーを顕微鏡で観察すると、菌糸は透明で隔壁を有している。分生子柄は、ほうき状（*penicillate*）と輪生（*verticillate*）とが混在している。*penicillate*の分生子柄（長さ100～200 $\mu$ m）は基底菌糸より直立または分岐し、先端



または分岐上でほうき状に輪生した大きさ  $2.5 \sim 3.0 \times 10 \sim 23 \mu\text{m}$  の数本のフィアライド上に分生子塊を形成する。

一方、*verticillate* の分生子柄（長さ  $25 \sim 50 \mu\text{m}$ ）は基底菌糸より直立し、先端または分岐上で長フラスコ形からきり状で先端に向かって先細となったフィアライド（大きさは  $3.0 \sim 5.0 \times 17 \sim 25 \mu\text{m}$ ）から単独で分生子塊が形成される。分生子は、*penicillate* では無色で大きさ  $2.5 \sim 3.0 \times 3.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$  の楕円形から長楕円形で一端がわずかに尖るものがある。*verticillate* では、無色の楕円形から長楕円形で大きさ  $2.5 \sim 3.0 \times 6.0 \sim 8.5 \mu\text{m}$  である。

## 2. 培養上の諸性状

本菌株を各種培地上で  $25^\circ\text{C}$ 、14日間培養した場合の肉眼的に観察した結果は、下記の第1表に示したとおりである。なお、これらの培地において、菌核または菌核様の構造は形成されない。

第1表

培地	培地上の生育状態 (コロニーの直径)	コロニー表 面の色調	コロニー裏 面の色調	可溶性 色素
バレイショ・ ブドウ糖寒天 培地	良好 ( $28 \sim 30 \text{ mm}$ ) 羊毛状、平坦	明灰色	明灰色	無し
コーン・ミー ル寒天培地	良好 ( $24 \sim 30 \text{ mm}$ ) 羊毛状、帯状	明灰色	明灰色	無し

麦芽汁寒天 培地	良好 (20~22 mm) 羊毛状、平坦	灰白色	明灰色	無し
三浦寒天 培地	良好 (22~24 mm) 羊毛状、ややしわ状	明灰色	明灰色	無し
海水澱粉 寒天培地	良好 (24~27 mm) 羊毛状、平坦	明灰色	乳白色	無し

### 3. 生理的、生態的性状

#### (1) 最適生育条件

本菌株の最適生育条件は、pH 4~8、温度 17~27℃、\* 海水濃度 0~50%である。

\* : 塩分濃度 3.4%の天然海水を使用

#### (2) 生育範囲

本菌株の生育範囲は、pH 3~10、温度 9~32℃、\* 海水濃度 0~200%である。

\* : 塩分濃度 3.4%の天然海水を使用

#### (3) 好気性、嫌気性の区別      好気性

以上のように、本菌株KF-1040株の形態的特徴、培養性状および生理的性状に基づき、既知菌種との比較を試みた結果、本菌株はグリオクラジウム (*Gliocladium*) 属に属する一菌株と同定し、グリオクラジウム エスピー KF-1040と命名した。なお、本菌株はグリオクラジウム エスピー KF-1040 (*Gliocladium* sp. KF-1040) として、

平成10年2月6日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-16629として寄託され、平成10年2月12日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在する通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求によりFERM BP-6251として寄託されている。

本発明で使用されるKF-1040物質生産菌としては、前述のグリオクラジウム エスピー KF-1040菌株が挙げられるが、自然変異株、X線照射、紫外線照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、2-アミノプリン等の変異処理により取得できる人工変異株、細胞融合株、遺伝子操作株も含め、グリオクラジウム属に属し、前記式〔I〕および〔II〕で表されるKF-1040物質（以下、特記しない限り「KF-1040物質」と総称する）を生産する菌株は、全て本発明において使用することができる。

本発明を実施するに当たっては、先ずグリオクラジウム属に属するKF-1040物質生産菌を培地に培養することにより行われる。上記KF-1040物質生産に適した栄養源としては、微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、さらには必要に応じ無機塩、ビタミン等を含有させた栄養培地が使用される。炭素源としては、グルコース、フラクトース、マルトース、ラクトース、ガラクトース、デキストリン、澱粉等の糖類、大豆油等の植物性油脂類が単独または組み合わせて用いられる。

窒素源としては、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆粉、綿実粉、コーン・スチープ・リカー、麦芽エキス、カゼイン、アミノ酸、尿素、アンモニウム塩類、硝酸塩類等が単独または組み合わせて用いられる。その他必要に応じてリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等の塩類、

鉄塩、マンガン塩、銅塩、コバルト塩、亜鉛塩等の重金属塩類やビタミン類、その他本KF-1040物質の生産に好適なものが適宜添加される。

培養するに当たり、発泡の激しいときには、必要に応じて液体パラフィン、動物油、植物油、シリコン等、界面活性剤等の消泡剤を添加してもよい。上記の培養は、上記栄養源を含有すれば、培地は液体でも固体でもよいが、通常は液体培地を用い、培養するのがよい。少量生産の場合にはフラスコを用いる培養が好適である。目的物質を大量に工業生産するには、他の醗酵生産物と同様に、通気攪拌培養するのが好ましい。

培養を大きなタンクで行う場合、生産工程において、菌の生育遅延を防止するため、はじめに比較的少量の培地に生産菌を接種培養した後、次に培養物を大きなタンクに移して、そこで生産培養するのが好ましい。この場合、前培養に使用する培地および生産培養に使用する培地の組成は、両者ともに同一であってもよいし、必要があれば両者を変えてもよい。

培養を通気攪拌条件で行う場合、例えばプロペラやその他機械による攪拌、ファメーターの回転または振とう、ポンプ処理、空気の吹き込み等既知の方法が適宜使用される。通気用の空気は滅菌したものを使用する。

培養温度は、本KF-1040物質生産菌が本KF-1040物質を生産する範囲内で適宜変更し得るが、通常は20～30℃、好ましくは27℃前後で培養するのがよい。培養pHは、通常は5～8、好ましくは7前後で培養するのがよい。培養時間は培養条件によっても異なるが、通常は10～20日程度である。

このようにして得られた本KF-1040物質は、培養菌体および培養濾液に存在する。培養物から目的とするKF-1040物質を採取するには、全培養

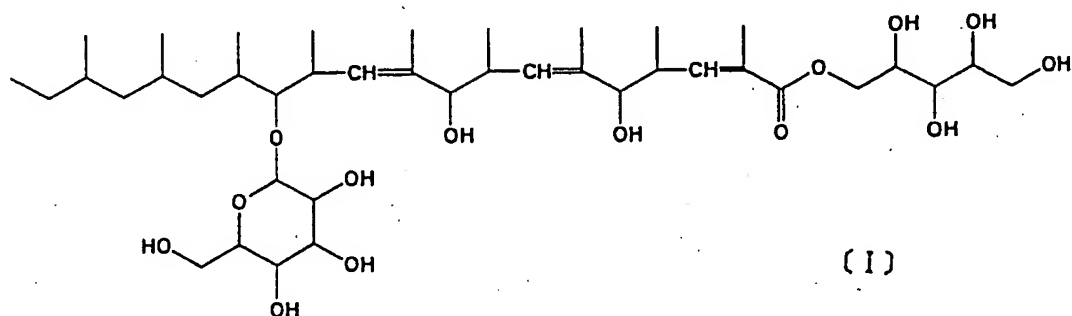
物をアセトン等の水混和性有機溶媒で抽出し、抽出液を減圧下有機溶媒を留去後、続いて残渣を酢酸エチル等の水不混和性有機溶媒で抽出することによって行われる。

上記の抽出法に加え、脂溶性物質の採取に用いられる公知の方法、例えば吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、遠心向流分配クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等を適宜組合わせ、あるいは繰り返すことにより、KF-1040物質を各成分に分離、精製することができる。

本発明によるKF-1040A物質の理化学的性状は次のとおりである。

- (1) 性状：白色粉末
- (2) 分子量：776（高速原子衝撃質量分析による）
- (3) 分子式： $C_{40}H_{72}O_{14}$
- (4) 比旋光度： $[\alpha]_D^{25} = +62^\circ$ （ $c = 0.1$ 、メタノール）
- (5) 紫外部吸収極大（メタノール中）：第1図に示すとおり、203 nm（ $\epsilon = 24900$ ）、220 nm（ $\epsilon = 18000$ ）、275 nm（ $\epsilon = 1200$ ）に極大吸収を有する。
- (6) 赤外部吸収極大（KBr錠）：第2図に示すとおり、1637、3434  $cm^{-1}$ に極大吸収を有する。
- (7) プロトン核磁気共鳴スペクトル（重メタノール中）：第3図に示すとおり。
- (8)  $^{13}C$ 核磁気共鳴スペクトル（重メタノール中）：第4図に示すとおり。
- (9) 溶剤に対する溶解性：メタノール、ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチルに可溶。水、ヘキサンに難溶。
- (10) 呈色反応：硫酸、リンモリブデン酸に陽性。
- (11) 酸性、中性、塩基性の区別：中性物質

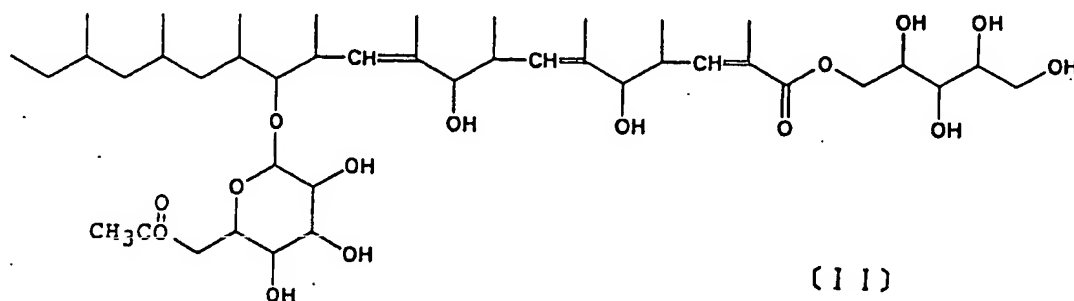
以上のように、本KF-1040A物質の各種理化学的性状やスペクトルデータを検討した結果、本KF-1040A物質は下記式〔I〕で表される化学構造であることが決定された。



本発明によるKF-1040B物質の理化学的性状は次のとおりである。

- (1) 性状：白色粉末
- (2) 分子量：818（高速原子衝撃質量分析による）
- (3) 分子式： $C_{42}H_{74}O_{15}$
- (4) 比旋光度： $[\alpha]_D^{25} = +120^\circ$ （ $c = 0.1$ 、メタノール）
- (5) 紫外吸収極大（メタノール中）：図5に示すとおり、204 nm（ $\epsilon = 43000$ ）、218 nm（ $\epsilon = 30300$ ）、272 nm（ $\epsilon = 2900$ ）に極大吸収を有する。
- (6) 赤外吸収極大（KBr錠）：第6図に示すとおり、1633、3417  $cm^{-1}$ に極大吸収を有する。
- (7) プロトン核磁気共鳴スペクトル（重メタノール中）：第7図に示すとおり。
- (8)  $^{13}C$ 核磁気共鳴スペクトル（重メタノール中）：図8に示すとおり。
- (9) 溶剤に対する溶解性：メタノール、ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチルに可溶、水、ヘキサン難溶
- (10) 呈色反応：硫酸、リンモリブデン酸に陽性
- (11) 酸性、中性、塩基性の区別：中性物質

以上のように、本KF-1040B物質の各種理化学的性状やスペクトルデータを検討した結果、本KF-1040B物質は下記式〔11〕で表される化学構造であることが決定された。



上記したように、本KF-1040A物質およびKF-1040B物質の各種理化学的性状について詳述したが、このような性質に一致する化合物はこれまでに全く報告されておらず、それ故、本発明によるKF-1040物質は新規物質であると決定した。

次に本KF-1040A及びB物質の生物学的性状について詳細に述べる。

#### (1) ラット由来ジアシルグリセロールアシル転移酵素に対する

##### 阻害作用

ジアシルグリセロールアシル転移酵素活性は、MayorekとBar-Tanaの方法（ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー、260巻、6528-6532頁、1985年）を一部改変して測定した。

すなわち、ラット肝より調製したミクロソーム画分を酵素源として用い、8 mM  $MgCl_2$ 、1 mg/ml ウシ血清アルブミン、2.5 mM ジイソプロピルフルオロリン酸を含む 175 mM トリス塩酸 (pH 8.0) バッファーに 0.75 mM ジオレオイルグリセロール、30  $\mu$ M  $[1-^{14}C]$  パルミトイル-CoA (0.02  $\mu$ Ci) を加え、全容量 200  $\mu$ l とし、23°C で 15 分間反応さ

せ、総脂質をクロロホルム：メタノール（1：2）混合液で抽出後、TLC（キーゼルゲルGF<sub>254</sub>、展開溶媒として石油エーテル：ジエチルエーテル：酢酸、80：20：1）で各脂質を分離後、RIラジオスキャナー（アンビス社製）でトリアシルグリセロール画分の放射活性を計測し、ジアシルグリセロールアシル転移酵素活性を測定した。

本酵素を50%阻害する薬剤濃度を算定した結果は、本KF-1040A物質は16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、本KF-1040B物質は9.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

（2）ヒト由来細胞（ヒトバーキットリンパ腫由来のRaji細胞）に

おけるトリアシルグリセロール生成に対する阻害作用

トリアシルグリセロール生成に対する影響は、供田らの方法（ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー、266巻、4214-4219頁、1991年）に従い、ヒト由来系細胞（ヒトバーキットリンパ腫由来Raji細胞）を用いて行った。

2.  $7 \times 10^6$  cells/mlのRaji細胞液 [ $1-^{14}\text{C}$ ] オレイン酸 (0.02  $\mu\text{Ci}$ ) を全容量200  $\mu\text{l}$ とし、37℃で30分間反応させ、総脂質をクロロホルム：メタノール（2：1）混合液で抽出後、以下ラット由来ジアシルグリセロールアシル転移酵素系に対する阻害作用において行った同様の方法で測定した。

トリアシルグリセロール生成に対する50%阻害する濃度を算定した結果は、本KF-1040A物質は10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、本KF-1040B物質は10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

（3）ラット脳由来中性スフィンゴミエリナーゼ阻害作用

ラット脳由来の中性スフィンゴミエリナーゼに対する影響は、Muraka



miとArimaの方法（ジャーナル・オブ・ニューロケミストリー、52巻、611-618頁、1989年）を改変して行った。

すなわち、ラット脳より調製した膜画分を酵素源として、20mM HEPES-NaOH緩衝液（pH7.4）、6.5mM  $MgCl_2$ 、0.1%トリトンX-100、25  $\mu$ M [N-メチル- $^3H$ ] スフィンゴミエリン（0.006  $\mu$ Ci）を加え、全量を50  $\mu$ lとした。37°Cで30分反応後、クロロホルム：メタノール（1：2、v/v）混合液を200  $\mu$ l加え、原料の [ $^3H$ ] スフィンゴミエリンと反応生成物の [ $^3H$ ] ホスホコリンを分離する。上層を50  $\mu$ lをバイアルにとり、液体シンチレーションカウンターで [ $^3H$ ] ホスホコリンの量を定量し、中性スフィンゴミエリナーゼ活性を測定した。

本酵素を50%阻害するKF-1040物質の濃度を算定した結果は、本KF-1040A物質で4.2  $\mu$ g/ml、本KF-1040B物質で6.1  $\mu$ g/mlであった。

#### （4）ヒト胎盤由来酸性スフィンゴミエリナーゼに対する影響

ヒト胎盤由来の酸性スフィンゴミエリナーゼに対する影響は、Jonesらの方法（バイオケミカルジャーナル、195巻、373-382頁、1981年）を一部改変して行った。

すなわち、ヒト胎盤由来の酸性スフィンゴミエリナーゼ（シグマ社製）を酵素源として、250mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）、0.1%NP-40（シグマ社製）、25  $\mu$ M [N-メチル- $^3H$ ] スフィンゴミエリン（0.006  $\mu$ Ci）を加え、全量を50  $\mu$ lとした。37°Cで30分反応後、クロロホルム：メタノール（2：1、v/v）混合液を200  $\mu$ l加え、 [ $^3H$ ] スフィンゴミエリンと反応生成物 [ $^3H$ ] ホスホコリンを分離する。上層を50  $\mu$ l

をバイアルにとり、液体シンチレーションカウンターで [ $^3\text{H}$ ] ホスホコリンを定量し、酸性スフィンゴミエリナーゼ活性を測定した。

本酵素を50%阻害するKF-1040物質の濃度を算出した結果、本KF-1040A物質で48  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、本KF-1040B物質で24  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

以上のように本発明による新規物質は、ジアシルグリセロールアシル転移酵素に対する阻害活性およびスフィンゴミエリナーゼに対する阻害活性を示すことから、動脈硬化、肥満、血栓症、炎症や免疫機能に関連した疾患の予防や治療に有用である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は本発明のKF-1040A物質の紫外外部吸収スペクトル（メタノール中）を示したものである。

第2図は本発明のKF-1040A物質の赤外部吸収スペクトル（KBr法）を示したものである。

第3図は本発明のKF-1040A物質のプロトン核磁気共鳴スペクトル（重メタノール中）を示したものである。

第4図は本発明のKF-1040A物質の $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル（重メタノール中）を示したものである。

第5図は本発明のKF-1040B物質の紫外外部吸収スペクトル（メタノール中）を示したものである。

第6図は本発明のKF-1040B物質の赤外部吸収スペクトル（KBr法）を示したものである。

第7図は本発明のKF-1040B物質のプロトン核磁気共鳴スペクトル（重メタノール中）を示したものである。

第8図は本発明のKF-1040B物質の $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル（重メタノール中）を示したものである。

### 実施例

寒天斜面培地で培養したグリオクラジウム エスピー KF-1040菌株（*Gliocladium* sp. KF-1040、FERM BP-6251）より、グルコース2.0%、ポリペプトン（日本製薬社製）0.5%、酵母エキス（オリエンタル酵母工業社製）0.2%、硫酸マグネシウム7水和物0.05%、リン酸二水素カリウム0.1%、寒天0.1%を50%天然海水で溶解した液体培地（pH6.0）を100mlずつ分注した500ml容三角フラスコ2本に1白金耳ずつ接種し、27℃で4日間振とう培養した。

そして、それを種培養液として、ポテト100g/lとグルコース1.0%を50%天然海水で溶解した液体培地を60本の1000ml容のルービンに300mlずつ仕込み、滅菌冷却後、種培養した培養液を3mlずつ各ルービンに無菌的に移植し、27℃で16日間静置培養した。

得られた全培養液に18リットルのアセトンを加えて良く攪拌した後、減圧濃縮し、これを再び酢酸エチルで抽出し減圧濃縮後、2.2gの粗物質を得た。これを少量のアセトニトリルに溶解し、30%アセトニトリル水で充填したODSカラム（200g、センシュー科学、ODS-SS-1020T）にかけ、50%アセトニトリル水で洗浄後、60%アセトニトリル水、さらに70%アセトニトリル水で溶出し、減圧濃縮によりそれぞれの溶出液より粗物質Aは87mgおよび粗物質Bは104mgを得た。

続いてそれぞれ粗物質を高速液体クロマトグラフィー（Shiseido

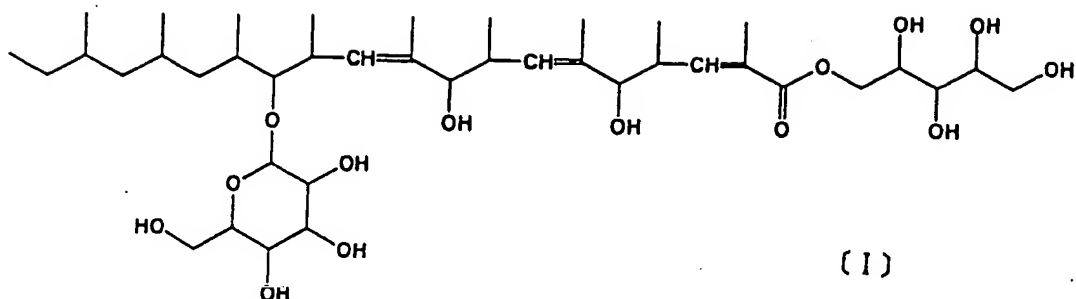
カプセルバック ODS-SGカラム、20×250mm、流速6.0ml/分、検出、UV215nm、溶出溶媒70%アセトニトリル水）を行い分画した。粗物質Aからは17分に溶出する画分を、また粗物質Bからは23分に溶出する溶出画分をそれぞれ集め、有機溶媒を除き、水層を酢酸エチルで抽出することにより、KF-1040A物質を16mg、KF-1040B物質を40mgそれぞれ得た。

#### 発明の効果

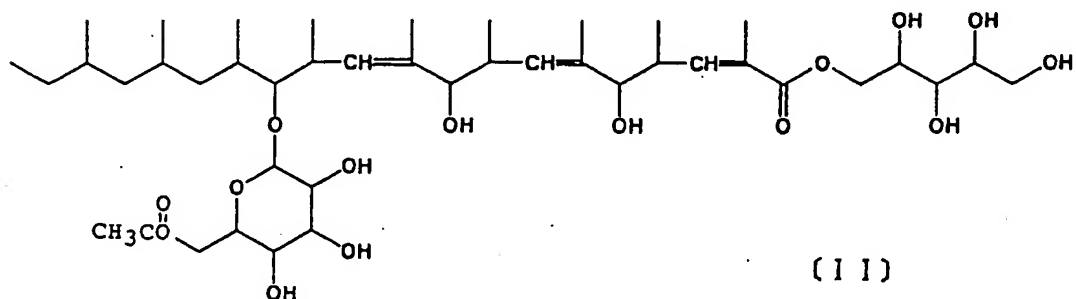
以上のことから本発明による新規KF-1040物質は、ジアシルグリセロールアシル転移酵素に対する阻害活性およびスフィンゴミエリナーゼに対する阻害活性を示すことから、動脈硬化、肥満、血栓症、炎症や免疫機能に関連した疾患の予防および治療に有用であると期待される。

## 請 求 の 範 囲

## 1. 下記式 (I)



で表される化合物であるKF-1040A物質および下記式 (II)



で表される化合物であるKF-1040B物質からなる新規KF-1040物質。

2. グリオクラジウム属に属し、KF-1040A物質および／またはKF-1040B物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養液中にKF-1040A物質および／またはKF-1040B物質を蓄積せしめ、該培養物からKF-1040A物質および／またはKF-1040B物質を採取することを特徴とする新規KF-1040物質の製造法。

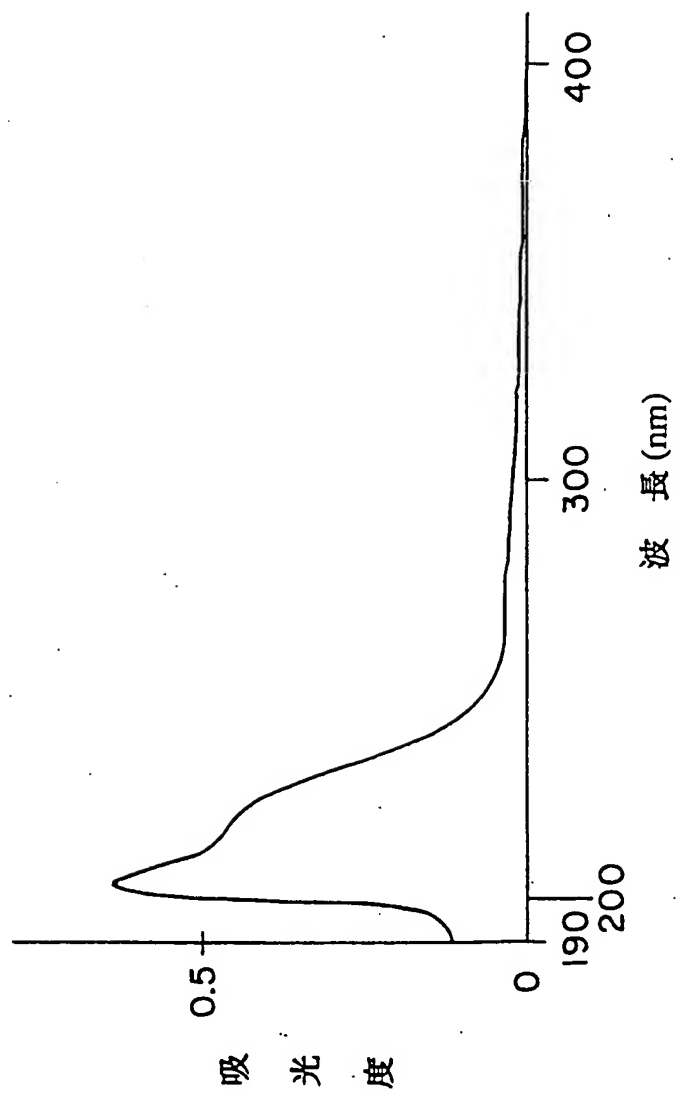
3. グリオクラジウム属に属し、KF-1040A物質および／またはKF-1040B物質を生産する能力を有する微生物が、グリオクラジウム エスピー KF-1040 (*Gliocladium* sp. KF-1040、F

ERM BP-6251)である請求項2に記載の製造法。

4. グリオクラジウム属に属し、KF-1040A物質および／または  
KF-1040B物質を生産する能力を有する微生物。

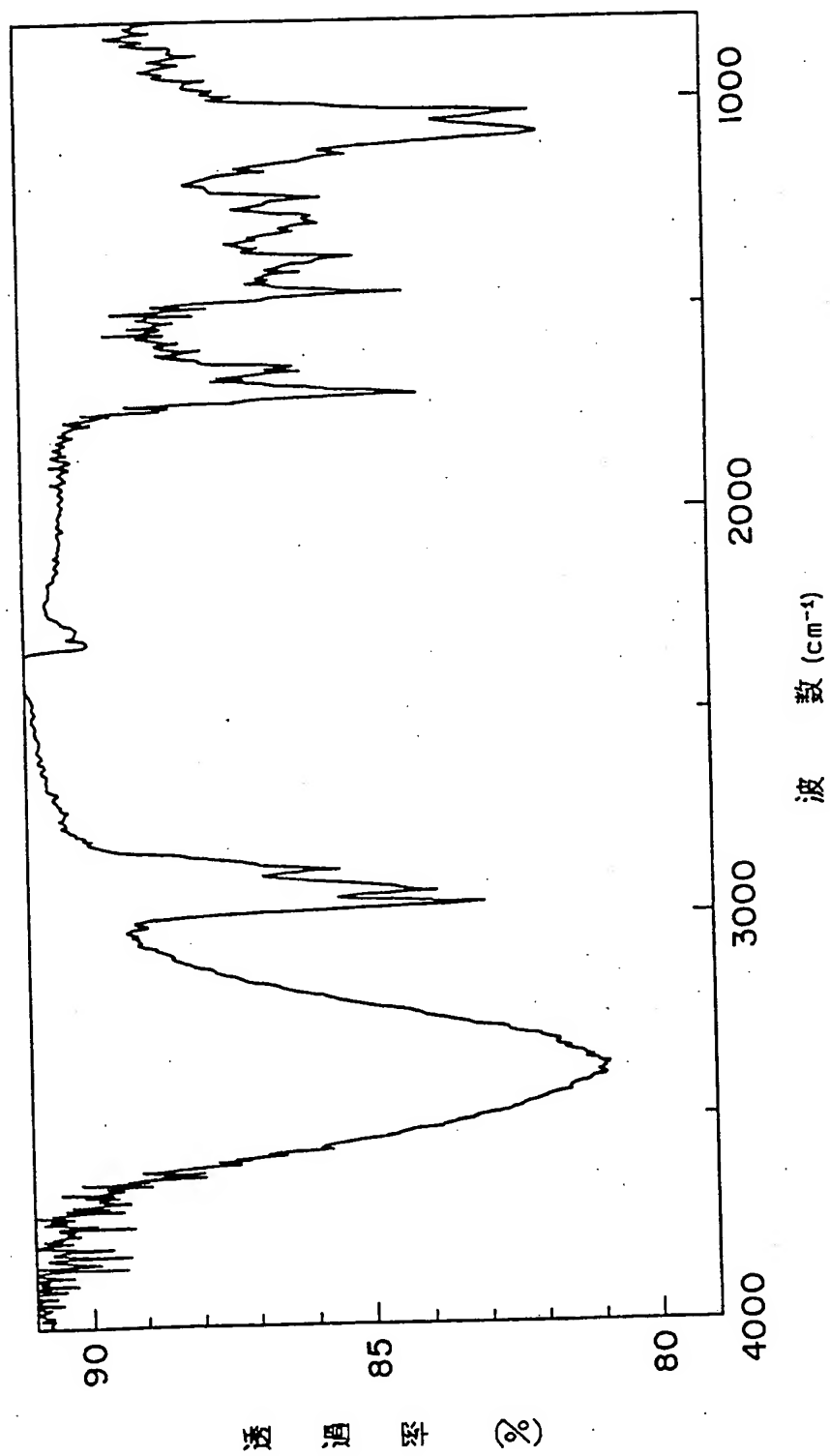
1/8

第 1 図



2/8

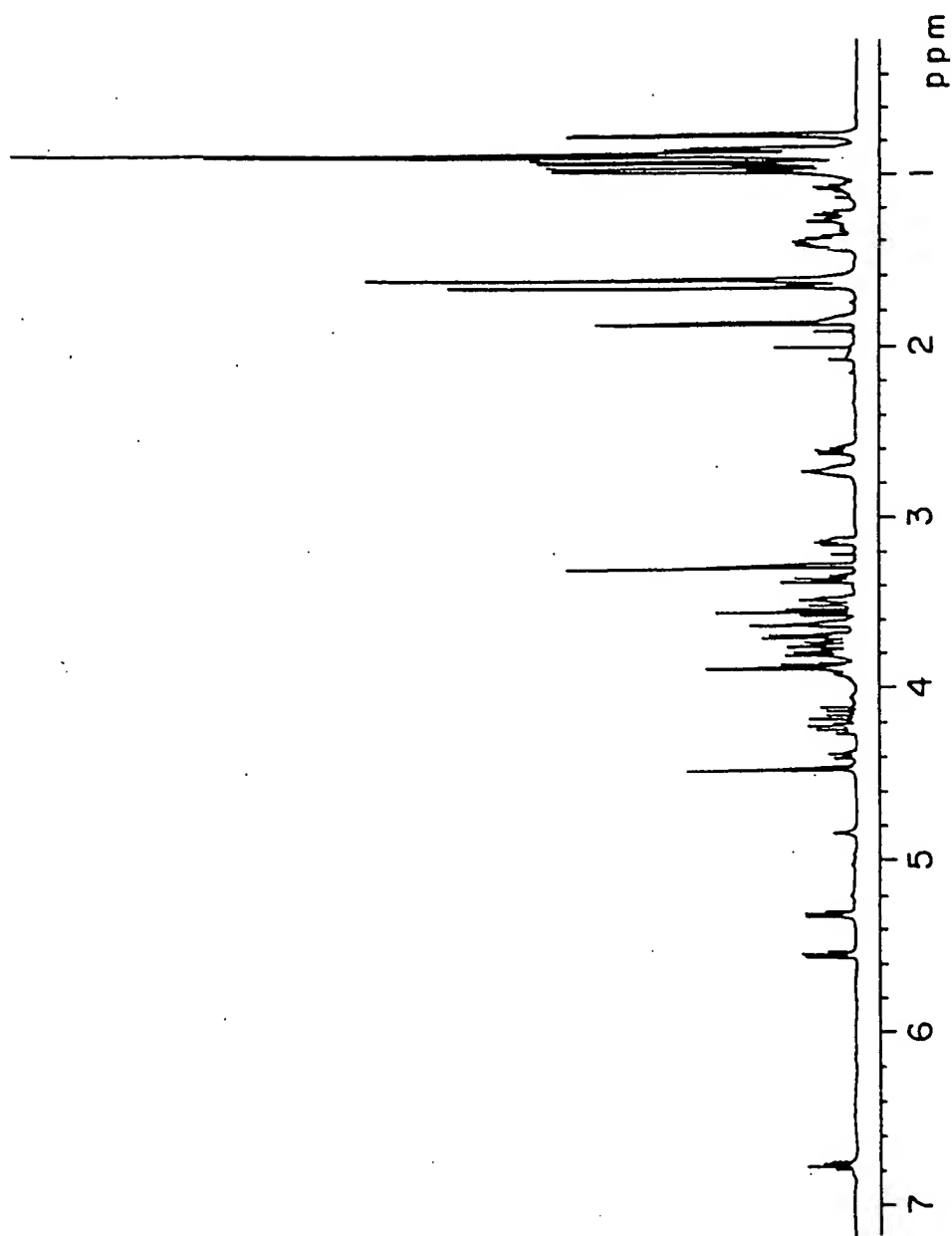
第 2 図





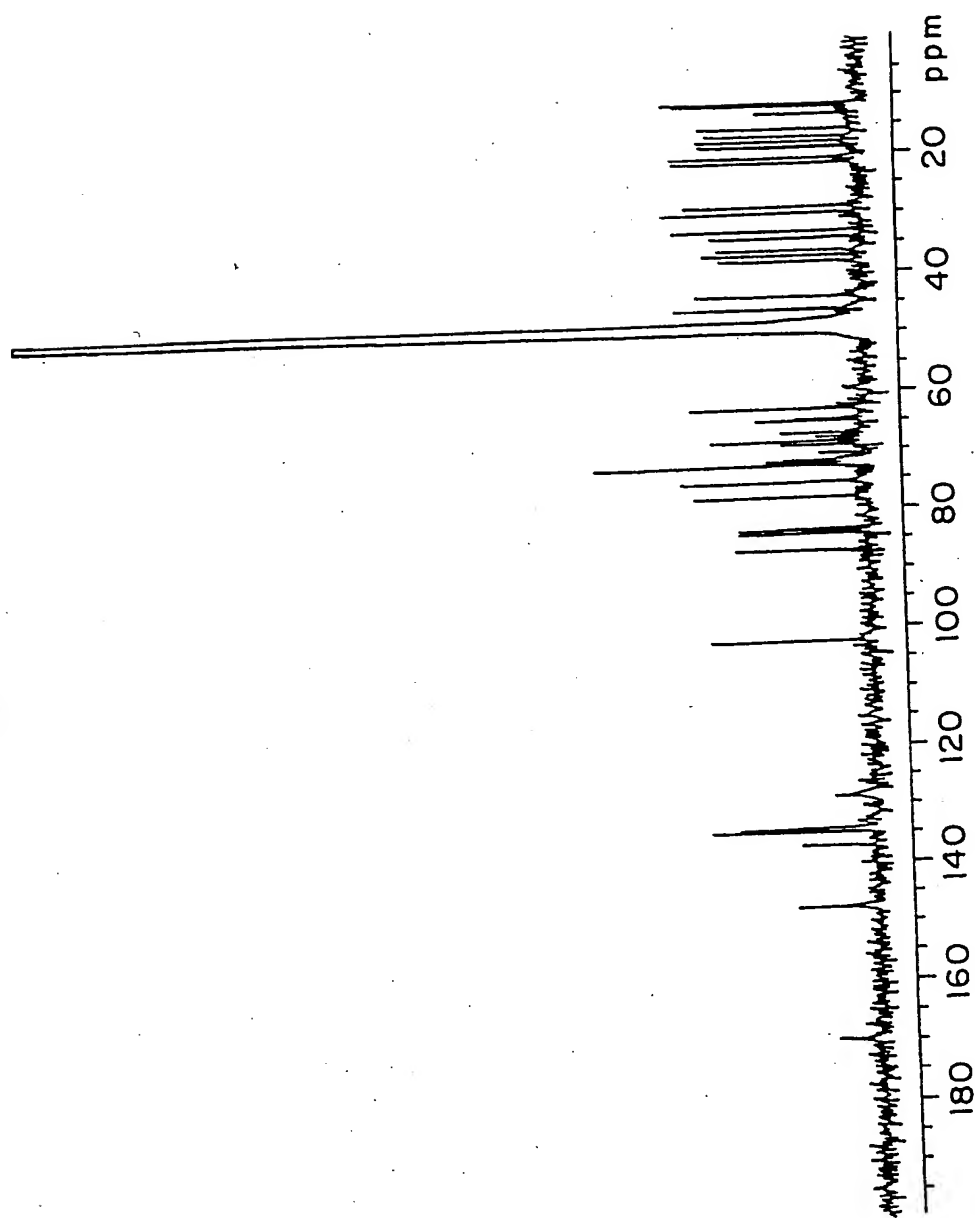
3/8

第 3 図



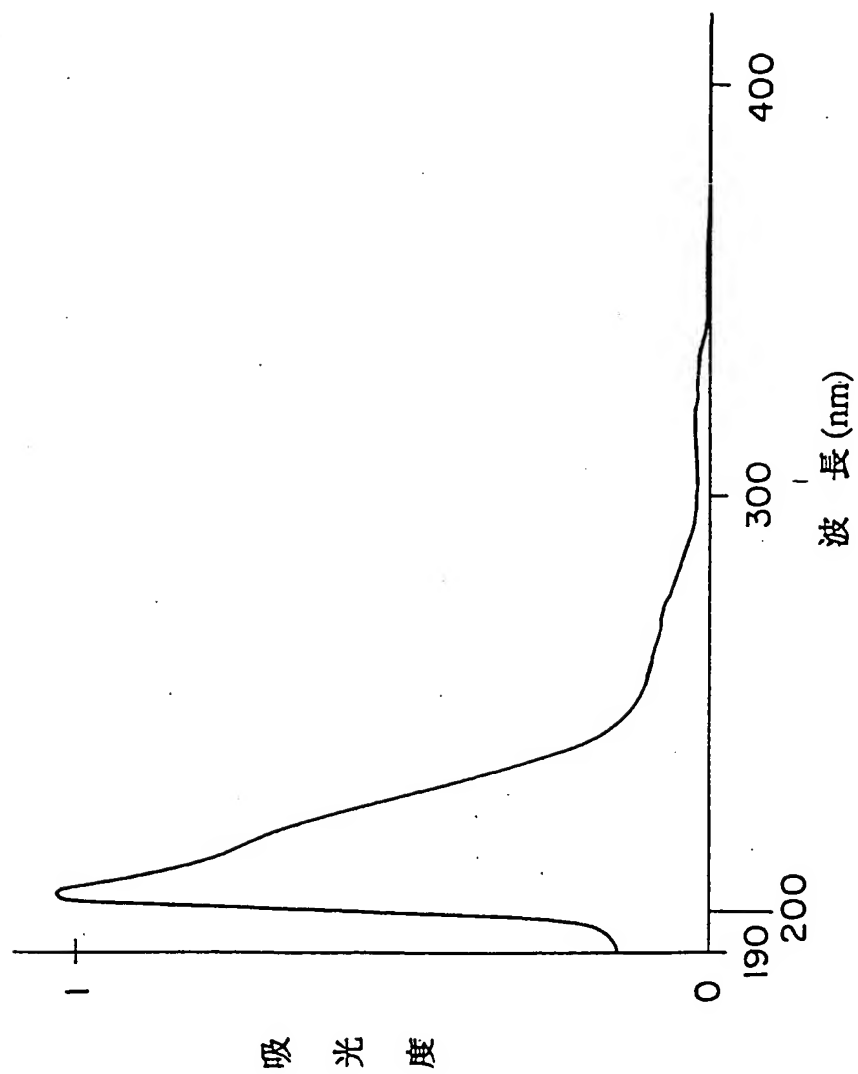
4/8

第4図



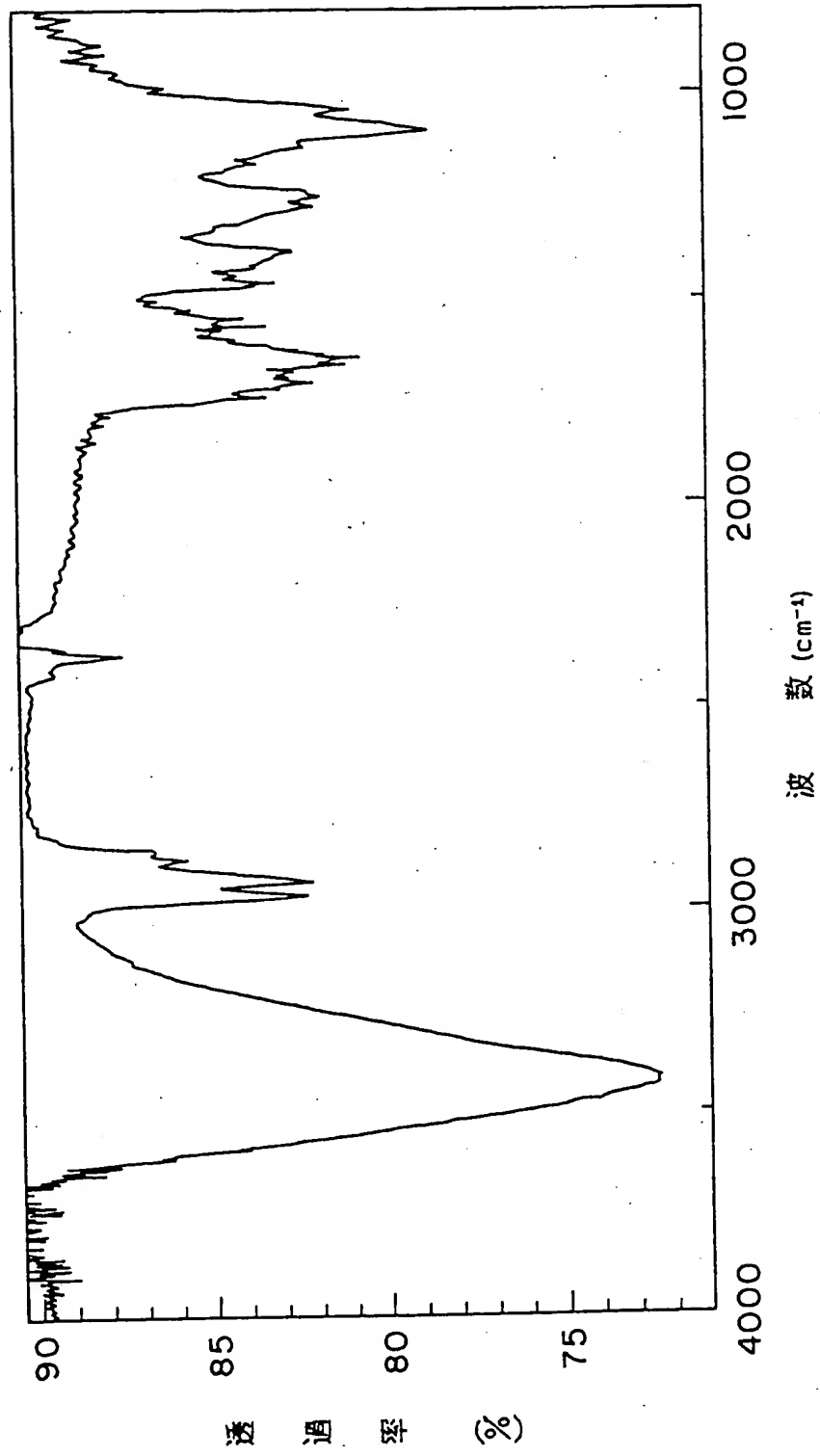
5/8

第5図



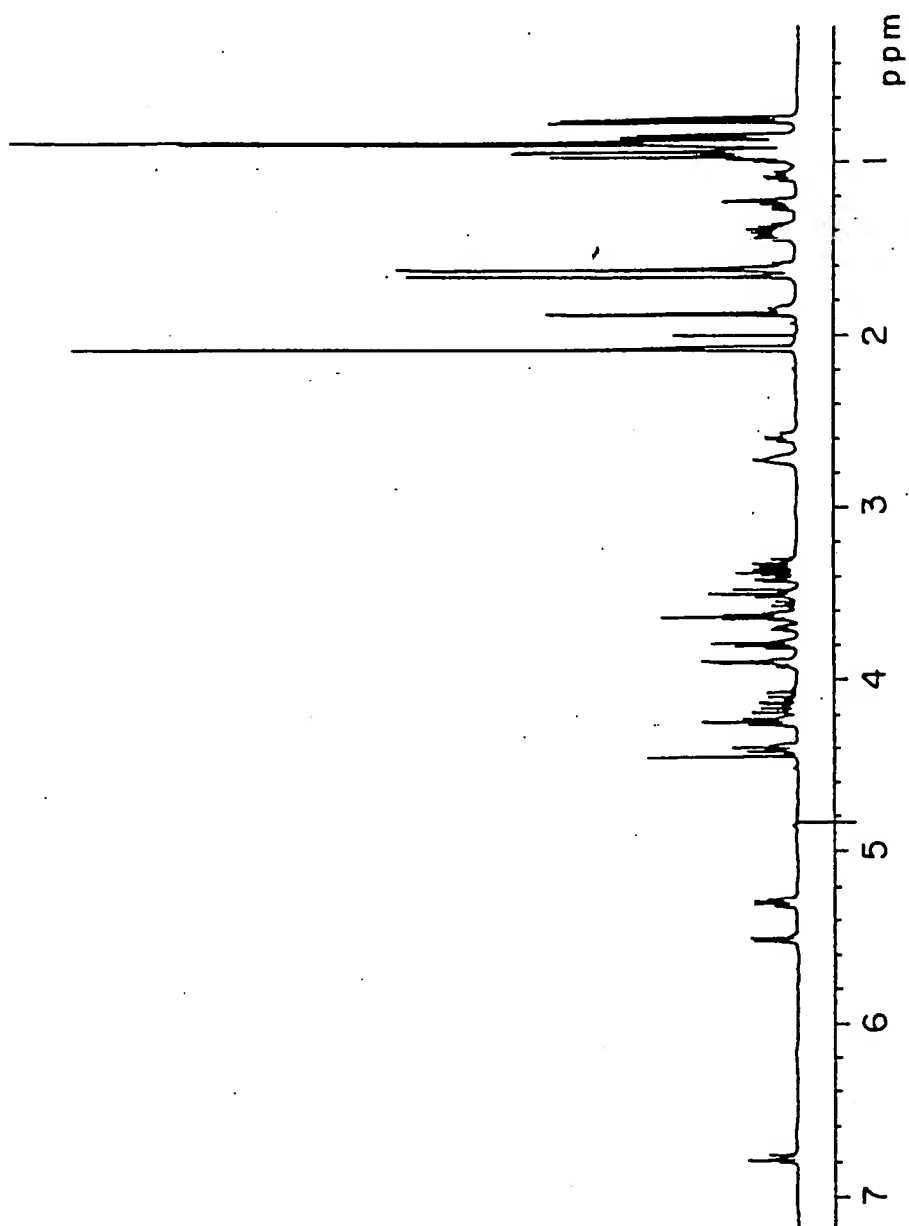
6/8

第 6 図



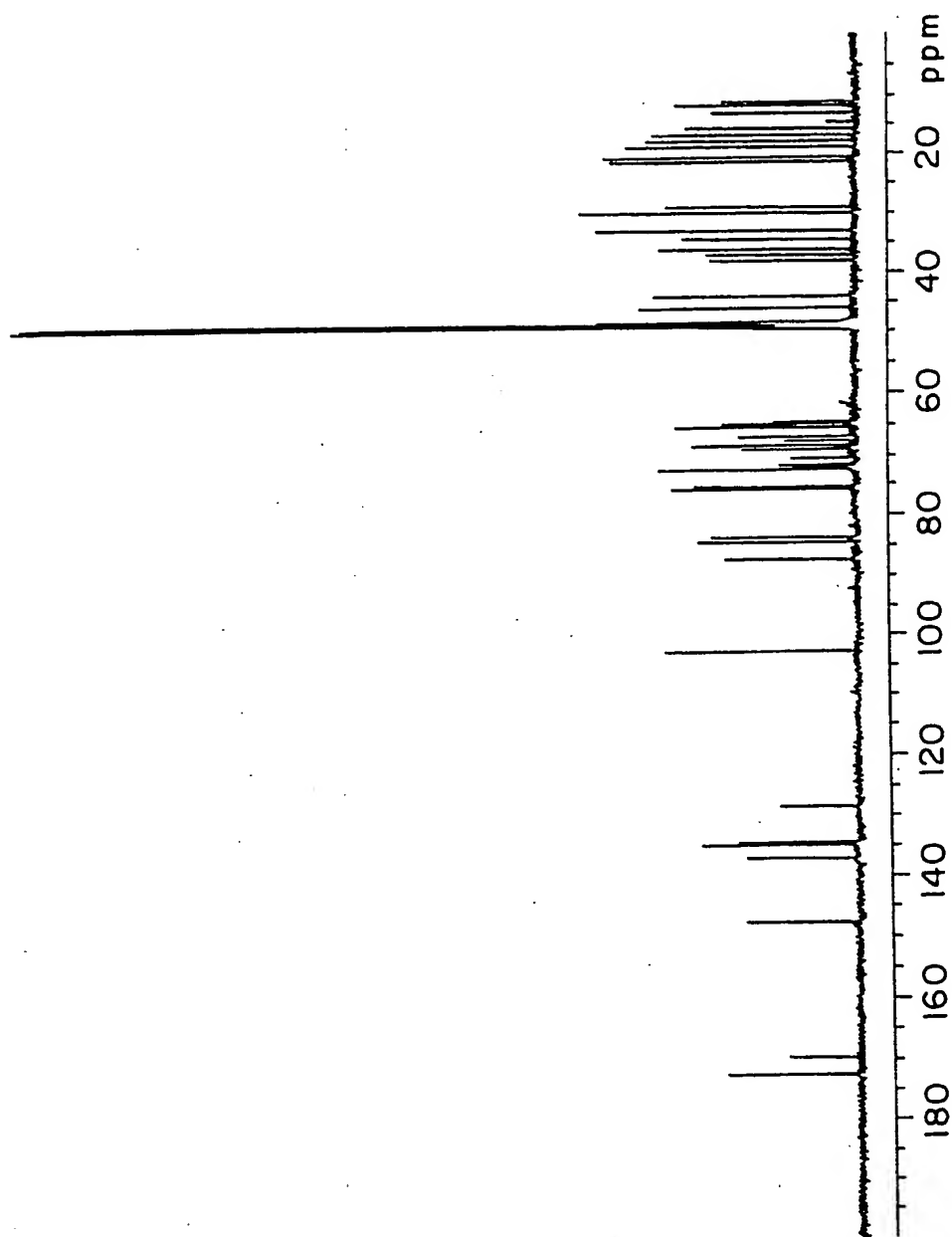
7/8

第 7 図



8/8

第 8 図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00614

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C07H15/10, C12P19/44, C12N1/14 // A61K31/71, (C12P19/44, C12R1:645) (C12N1/14, C12R1:645) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C07H15/10, C12P19/44, C12N1/14, A61K31/71 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY (STN), CA (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 2-138195, A (Merck & Co., Inc.), May 28, 1990 (28. 05. 90) & US, 4814324, A & EP, 366838, A	1-4
A	JP, 4-360894, A (The Kitasato Institute), December 14, 1992 (14. 12. 92) (Family: none)	1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search June 8, 1998 (08. 06. 98)		Date of mailing of the international search report June 16, 1998 (16. 06. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/00614

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C07H15/10, C12P19/44, C12N1/14 // A61K31/71,  
(C12P19/44, C12R1:645) (C12N1/14, C12R1:645)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C07H15/10, C12P19/44, C12N1/14, A61K31/71

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN)

CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 2-138195, A (メルク エンド カムパニー インコーポレーテッド), 28.5月.1990 (28.05.90) & US, 4814324, A & EP, 366838, A	1~4
A	J P, 4-360894, A (社団法人北里研究所), 14.12月.1992 (14.12.92) (ファミリーなし)	1~4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.06.98

国際調査報告の発送日

16 June 1998 (16.06.98)

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

谷口 博

印

4 B

7 4 3 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448